

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 10 September 2001 (10.09.01)	
International application No. PCT/DE00/02753	Applicant's or agent's file reference 990809PCT
International filing date (day/month/year) 12 August 2000 (12.08.00)	Priority date (day/month/year) 28 September 1999 (28.09.99)
Applicant THIELECKE, Hagen et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 04 April 2001 (04.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

16/089,231
3

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 990809PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/02753	International filing date (day/month/year) 12 August 2000 (12.08.00)	Priority date (day/month/year) 28 September 1999 (28.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 15/12		
Applicant FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.	
<input checked="" type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of <u>6</u> sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 April 2001 (04.04.01)	Date of completion of this report 06 February 2002 (06.02.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/02753

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 2,3,5-12, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages 1,1a,4, filed with the letter of 18 July 2001 (18.07.2001)
- ☒ the claims:
pages 2-6, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1,7-10, filed with the letter of 18 July 2001 (18.07.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1/3-3/3, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02753**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I. 5

The amendments submitted with the letter of 18 July 2001 introduce substantive matter which, contrary to PCT Article 34(2)(b), goes beyond the disclosure in the international application as filed.

The amendments concerned are the expressions "vertically arranged" now used in respect of a specific tube in Claim 1, line 24, and in the description, page 4, line 14.

The original application in fact discloses only that a "spheroid" (6, Fig. 2) is introduced into the tube (1, 2, Fig. 2) by gravitational force using a movable plunger (10, Fig. 2) with the aid of a hose (9, Fig. 2) which joins the plunger and the tube. The spheroid is then centrally positioned in the tube by means of pressure differences generated by suitably operating the plunger (see page 11, lines 2-11). Even though it is clear from this that there needs to be a certain height difference between the plunger and the tube, that does not mean that the tube absolutely has to be vertically arranged. This last feature is not referred to or explicitly mentioned anywhere in the original application (in particular this feature does not follow from the embodiments shown diagrammatically in Fig. 1-3, since the direction of the gravitational force is never defined).

The above amendments have not therefore been considered below. In particular, the following statements relate to Claim 1 as filed.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02753

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4, 7-10	YES
	Claims	1-3, 5, 6	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1.

This report makes reference to the following documents:

D1: US-A-4 055 799 (COSTER HANS ET AL) 25 October 1977
(1977-10-25)

D2: US-A-5 691 633 (LIU ET AL) 25 November 1997 (1997-
11-25)

(document D2 was not cited in the international search
report).

2.

**The subject matter of Claim 1 is not novel for the
following reasons (PCT Article 33(2)):**

Document D1 discloses a device (see D1, Fig. 1) for
characterizing "spheroids" (e.g. individual cells, cells
in associations etc) (see D1, abstract; column 2, line 59
to column 3, line 4; and 12, Fig. 1-2), said device
comprising:

- a tube (7, 3, 9, 4, 8) which, in a region (9) of its
longitudinal axis, has an internal diameter that is
smaller than the diameter of the "spheroids" to be
characterized (12), the tube in the region (9) being made

of electrically insulating material (2) (see D1, column 3, lines 43-52);

- a first electrode pair (5, 6) in the tube on a first side (3) of the region (9) and a second electrode pair (5, 6) in the tube on a second side (4) of the region (9) opposite the first side, each electrode pair (5, 6) having an inner electrode (6) and an outer electrode (5), the inner electrode (6) being disposed closer to the region (9) than is the outer electrode (5); and
- a measuring arrangement (see D1, Fig. 3) with a power source (13) connected to the outer electrodes (5) and with a voltmeter (15) connected to the inner electrodes (6) (see D1, column 6, lines 7-14).

The subject matter of Claim 1 is therefore known from D1 (PCT Article 33(2)).

3.

The subject matter of Claim 7 is not inventive for the following reasons (PCT Article 33(3)):

3.1

Document D1, which is considered to be the prior art closest to the subject matter of Claim 7, discloses a method for characterizing "spheroids" (e.g. individual cells, cells in associations etc) (see D1, abstract; column 2, line 59 to column 3, line 4; and 12, Fig. 1-2), said method having the following steps:

- provision of a tube (D1, 7, 3, 9, 4, 8, Fig. 1) which, in a region (D1, 9, Fig. 1), has an internal diameter that is smaller than the diameter of the spheroids to be characterized, the tube in the region (D1, 9, Fig. 1) being made of electrically insulating material (D1, 2, Fig. 1-2) at least on its interior circumference (see D1,

column 3, lines 43-52);

- filling of the tube with a liquid culture medium (see D1, column 6, lines 19-21);
- introduction of a spheroid (D1, 12, Fig. 1) into the region (D1, 9, Fig. 1-2) of the tube so that the spheroid is in continuous mechanical contact with the inner wall of the tube region (see D1, column 6, lines 22-25; and column 3, lines 65-68).

3.2

The subject matter of Claim 7 differs from D1 by the following steps:

- generation of an alternating current flow in the culture medium along the longitudinal axis of the tube via the spheroid; and
- measurement of the alternating voltage drop along the longitudinal axis of the tube via the spheroid at different alternating current flow frequencies in order to obtain an impedance spectrum.

In the light of the description (page 5, lines 4-6) these steps correspond to those used with a commercially available impedance analyzer, for example.

3.3

By contrast, D1 uses a pulse technique with current pulses of increasing amplitude to establish the breakdown voltage of the cells.

This does not produce spectral information, whereas this is explicitly mentioned in document D2, which likewise relates to the characterization of cells (see D2, column 2, lines 18-30).

3.4

It is, however, clear from D2 that establishing an impedance spectrum is an advantageous procedure for characterizing cells and is already used in the prior art (see for example D2, column 1, lines 21-26 and 45-47).

3.5

The problem addressed by the present application can therefore be seen as being to provide a method by which to establish an impedance spectrum of specific "spheroids" (D1, 12, Fig. 1-2) which are placed in appropriate tapers (D1, 9, Fig. 1-2) in a device as defined in D1.

3.6

The use of a commercially available impedance analyzer appropriately coupled to the electrodes (D1, 5, 6, Fig. 1-2) is one of a plurality of obvious possibilities from which a person skilled in the art would choose according to the circumstances in order to solve the problem of interest. In so doing a skilled person would arrive at the features of Claim 7 without being inventive (see point 3.2 above).

Claim 7 does not therefore satisfy the requirements of PCT Article 33(3).

4.

Dependent Claims 2-6 and 8-10 contain no features which, combined with the features of any claim to which they refer, meet the PCT requirements for novelty and/or inventive step. The reasons are as follows.

4.1

The subject matter of Claims 2, 3, 5 and 6 is not novel (PCT Article 33(2)):

Claim 2: see D1, Fig. 1, where the right-hand side of the region (9) has a funnel-shaped widening.

Claim 3: see D1, Fig. 1, where the electrodes (5, 6) extend in a radial direction relative to the tube portions (7, 8) and the tube portions (3, 4) respectively.

Claim 5: see D1, column 5, lines 42-26.

Claim 6: see D1, Fig. 1.

4.2

The subject matter of Claims 4 and 8-10 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)):

Claim 4: in the light of the cell diameter range mentioned in D1 (column 3, lines 22-25), Claim 4 defines an obvious selection of internal diameters for the tapers (D1, 9, Fig. 1-2).

Claim 8: see D1, column 6, lines 22-25.

Claim 9: the feature defined in Claim 9 is equivalent to resistance measurement (description page 6, lines 22-28), which is not inventive in relation to D1 (see D1, column 4, lines 15-21).

Claim 10: see D1, column 4, lines 1-5; and filter 10, Fig. 2.

**International Preliminary Examining Report of
6.02.2002**

1. This international preliminary examining report is issued by the Office assigned therewith and is forwarded to the applicant in accordance with Article 36.

2. This report comprises all told 8 pages including the cover page.

Moreover. The report is accompanied by ENCLOSURES; these are pages containing specifications, claims and/or drawings which were altered and are the basis of this report, and/or pages containing amendments made before this authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Guidelines for PCT)

These enclosures comprise all told 6 pages.

3. This reports contains statements regarding the following items:

I X Basis of the report

V X Reasoned opinion to according Rule 66.2a)ii) regarding novelty, inventive step and commercial applicability: documents and explanation in support thereof

I. Basis of the Report

~~1. This report was drawn up on the basis (replacement pages filed upon request by the Office in accordance with Article 14 shall be considered within the scope of this report as "originally filed" and are not attached as they contain no amendments (Rules 70.16 and 70.17)).~~

Specification, Pages:

2,3,5-12 original version
1,1a,4 filed on 19/07/2001 with letter of
18/07/2001

Claims, Nos.:

2-6 original version
1,7-10 filed on 19/07/2001 with letter of
18/07/2001

Drawings, pages:

1/3-3/3 original version

5. This report has been issued without taking into consideration (some) the amendments, because in the opinion of this authority these amendments go beyond the disclosed content of the originally filed version for the given reasons.

(On replacement pages, which contain such amendments, is indicated under point 1; which are to be attached to this report).

see accompanying page

V. Reasoned opinion to according Rule 35(2) regarding novelty, inventive step and commercial applicability: documents and explanation in support thereof

1. Opinion

Novelty (N)	Yes: Claims 4, 7-10 No: Claims 1-3, 5, 6
-------------	---

Inventive step (IS)	No: Claims 1-10
---------------------	-----------------

Commercial applicability (CA)	Yes: Claims 1-10
-------------------------------	------------------

Documents and Explanations

see accompanying page

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ACCOMPANYING PAGE

To Point I
Basis of the report

The amendments filed with the letter of 18/07/2001 introduce subject matter that is in conflict with Article 34(2)(b)PCT go beyond the disclosed content of the international application at the application period.

Concerned is the term "vertically disposed" in claim 1, l. 24 respectively in the specification, p. 4, l. 14 regarding a specific tube.

Actually, the original application only reveals that a "spheroid" (6, fig. 2) is introduced into the tube (1,2, fig.) by means of gravitational force from a moveable piston (10; fig. 2) and that with the aid of a tube (9, fig. 2) which connects the piston and the tube. Then the spheroid is positioned in the center of the tube (cf. p. 11, 12-11) by means of difference in pressure generated by suited operation of the piston. Even if it is clear that a difference in the height of the piston and the tube is necessary it does not mean that the tube necessarily has to be disposed vertically. This last feature is not mentioned anywhere in the original application or mentioned unequivocally (in particular this feature is not apparent from the embodiments shown schematically in figs. 1-3, because the direction of the gravitational force is never defined).

The above mentioned changes were therefore not considered in the following. In particular, the following statements relate to claim 1 which was filed during the application period.

To Point V.
Reasoned opinion according to Rule 35(2) regarding novelty, inventive step and commercial applicability: documents and explanation in support thereof

1.
Reference is made to the following documents:

D1: US-A-4 055 799 (COSTER HANS ET AL) 25 October 177 (1977-10-25)
D2: US-A-5 691 633 (LIU ET AL) 25 November 1997 (1997-11-25)
(Document D2 was not mentioned in the international Search Report)

2.
The subject matter of claim 1 is not novel for the following reasons (Art. 33(2)PCT):

Document D1 discloses a device (see **fig. 1**, D1) for characterizing "spheroids" (e.g. individual cells, cell structures, etc. - see abstract and col.2, l. 59-col. 3, l.4, and 12, fig. 12 D1) comprising:

- a tube (7,3,9,4,8) which has an inner diameter in a region (9) of its longitudinal axis which is smaller than the diameter of the to-be-characterized "spheroid" (12) with the tube being composed of an electrically insulating material (2) in the region (9) (see col. 3, l. 43-52, D1);
- a first pair of electrodes (5, 6) in the tube on a first side (3) of region (9) and a second pair of electrodes (5, 6) on a second side (4) of the region (9), which is opposite the first side, with each pair of electrodes (5, 6) has an inner electrode (6) and an outer electrode (5) of which the inner electrode (6) lies close to the region (9) than the outer electrode (5); and
- a measuring arrangement (see **fig. 3**, D1) having a current source (13), which is connected to the outer electrodes (5) and a voltage meter (15) which is connected to the inner electrodes (6) (see col. 6, l. 7-14, D1).

The subject matter of claim 1 is therefore known from D1 (Art. 33(2) PCT).

3.

The subject matter of claim 7 possesses no inventive step for the following reasons (Art.33(3)PCT):

3.1

Document D1, which is considered as the nearest state of the art for the subject matter of claim 7, discloses a method of characterizing "spheroids" (e.g. single cells, cell structures etc. see abstract and col. 2, l. 59-col. 3, l.4, and 12, fig. 1-2, D1) having the following steps:

-
- provision of a tube (7,3,9,4,8, fig. 1, D1) which has an inner diameter in a region (9, fig.1, D1) which is smaller than the diameter of the to-be-characterized spheroid, with the tube being composed of an electrically insulating material (2, fig. 1-2, D1) at least in its inner circumference (see col. 3, l. 43-52, D1);
 - filling the tube with a liquid culture medium (see col. 6, l. 19-21, D1);
 - introduction of a spheroid (12, fig. 1, D1) in the region (9, fig. 1-2, D1) of the tube so that the latter is in mechanical contact over the entire circumference to the inner wall of the region of the tube (see col. 6, l. 22-25 and col. 3, l. 65-68, D1).

3.2

The subject matter of claim 7 differs from D1 by the following steps:

- generating an alternating current flow in the culture medium along the longitudinal axis of the tube over the spheroid; and
- measuring the drop in alternating voltage along the longitudinal axis of the tube at the spheroids with different frequencies of the alternating current flow in order to obtain an impedance spectrum.

With regard to the description (p. 5, l. 4.6), these steps correspond, for example, to using a commercially available impedance analyzer.

3.3

In contrast to this, D1 utilizes a pulse technology with rising current pulses in the amplitude in order to determine the break-through voltage of the cells.

No spectral information is determined in this manner, which is explicitly mentioned in document D2, which also relates to characterizing cells (see col. 2, l. 18-30, D2).

3.4

However, D2 clearly discloses that the determination of an impedance spectrum represents an advantageous procedure for characterizing cells, and is already used in the state of the art (cf. e.g. col. 1, l. 21-26 and col. 45-47, D2).

3.5

The object of the present application can therefore be considered to be providing a method to determine an impedance spectrum of certain "spheroids" (12, fig. 1-2, D1) which are placed in corresponding tapering (9, fig. 1-2, D1) in a device according to D1.

3.5

The use of an adapted commercial impedance analyser coupled to the electrodes (5,6, fig. 1-2, D1) is one of several possibilities from which someone skilled in the art can choose corresponding to the circumstances in order to solve the given object. Someone skilled in the art, therefore, can arrive at the features of claim 7 without inventive step (see point 3.2 above).

Claim 7 therefore does not meet the requirements of Art. 3383) PCT).

4.

The dependent claims 2-6, 8-10 do not contain any features that in combination with the features of any claim to which they relate fulfill the requirements of the PCT Agreement regarding novelty, respectively inventive step. The reason therefore are the following:

4.1

The subject matter of claims 2, 3, 5, 6 is not new (Art. 33(2) PCT):

Claim 2: see fig. 1, D1, whereas the right side of the region (9) is provided with a conical-shaped enlargement.

Claim 3: see fig. 1, D1, whereas the electrodes (5, 6) extend radially in relation to the partial sections (7, 8), respectively the partial sections (3, 4) of the tube.

Claim 5: see col. 5, l. 42-46, D1.

Claim 6: see fig. 1, D1.

4.2

The subject matter of claims 4, 8-10 possesses no inventive step (Art. 33(3)PCT):

Claim 4: with regard to the cell diameter range mentioned in D1 (see col. 3, l.22-25, D1), claim 4 defines an obvious selection of inner diameters for taperings (9, fig. 1-2, D1).

Claim 8: see col. 6, l. 22-25, D1).

Claim 9: the feature defined in claim 9 corresponds to resistance measuring (description, l. 6, l.22-28), which possess no inventive step compared to D1 (see col. 4, l. 15-21, D1).

Claim 10: see col. 4, l. 1-5 and filter 10, fig. 2, D1.

Amend d page

Device and Method for Characterizing Spheroids

The present invention relates to a device and a method for characterizing cell structures aggregated under microgravitation conditions. Under microgravitation conditions aggregated 3D cell structures, so-called spheroids, can be employed as models for manners of proceeding in gene technology and pharmacology.

Using spheroids as models for manners of proceeding in pharmacology and gene technology requires characterizing them with regard to the effect of drugs respectively of gene manipulations.

Presently molecular-biological methods, such as for example nucleic acid hybridization or utilization of antibodies are employed for characterizing. Evaluation can occur by means of fluorescence microscopy. For this, however, complicated slides have to be prepared.

This method of characterizing spheroids is therefore complicated and requires experienced skilled staff for evaluation. A high throughput, desirable particularly in industrial application, automation and nondestructive characterizing are not possible with the prior art methods.

US 4 055 799 discloses a device according to the generic part of claim 1 as well as a method for determining the electric and dielectric

-1a-

properties of cell membranes of individual living cells or of living cells in a layer-like arrangement with a device of this type. In this method, the dielectric properties of the cell membrane of individual cells are determined by voltage impulses of increasing amplitudes being applied to the cell membranes of individual cells until the break-through voltage of the cell membrane has been attained. The level of the voltage of this break-through voltage is determined with the measuring electrodes. Information about the elastic and dielectric properties of the cell membrane are derived from the level of this break-through voltage. However, the required measuring times do not permit sufficient flow through. Moreover, it is not clear in what manner this method can be utilized for characterizing spheroids.

The object of the present invention is to provide a device and a method for characterizing spheroids, which

-4 -

faulty measuring results. Due to this arrangement, the current always flows through the spheroid. Thus, impedances and impedance spectra of spheroids can be measured with high sensitivity. In this manner, the rapid and nondestructive characterizing of these spheroids is possible. In particular, parameters for automatic test systems can also be gained from the impedance spectra so that testing the effect of drugs and genetic manipulations can be realized on spheroids with a high throughput.

The invented device consists of a vertically disposed tube composed of an electrically insulating material or coated with a corresponding coating - at least in the positioning region - and has in the positioning region, where the spheroid is positioned during measuring, an inner diameter that is smaller than the diameter of the to-be-characterized spheroid. A first pair of electrodes having an inner and an outer electrode is disposed on one side of this region. Disposed on the second side of the positioning region located opposite in direction of the longitudinal axis of the tube, is a second pair of electrodes having an inner and an outer electrode. In each case, the inner electrode lies closer to the positioning region than the outer electrode. The electrodes can be placed at the inner circumference of the tube or can extend along the inner volume of the tube.

Furthermore, the device is provided with a measuring arrangement for feeding in an alternating current between the two outer electrodes and for determining the resulting alternating voltage between the two inner

New Claims 1 and 7 to 10What Is Claimed Is:

1. A device for characterizing spheroids comprising

- a tube (1, 2) which has an inner diameter in a region (1) of its longitudinal axis which is smaller than the diameter of the to-be-characterized spheroid (6), with said tube being composed of an electrically insulating material at least at its inner circumference;
- a first pair of electrodes (3, 4) in said tube (2) on one first side of said region (1) and a second pair of electrodes (3, 4) in said tube (2) on a second side of said region (1), which lies opposite said first side, with each pair of electrodes (3,4) having an inner electrode (3) and an outer electrode (4) of which said inner electrode (3) lies closer to said region (1) than said outer electrode (4); and
- a measurement arrangement (11,12) having a current source (11) which is connected to the outer electrodes (4) and a voltage meter (12) which is connected to the inner electrodes (3);

wherein, said tube (1,2) is disposed vertically.

7. A method for characterizing spheroids having the following steps:

- provision of a tube (1,2) which has in region (1) an inner diameter which is smaller than the diameter of the to-be-characterized spheroid, with said tube in said region (1) being composed of an electrically insulating material at least at its inner circumference;
- filling said tube (1,2) with a liquid culture medium (5);
- introduction of a spheroid (6) into said region (1) of said tube (1,2) in such a manner that the latter has mechanical contact over the entire circumference with the inner wall of said region (1) of said tube (1,2);
- generation of an alternating current flow in said culture medium (5) along the longitudinal axis of said tube over said spheroid (6); and
- measurement of the drop in alternating voltage over said spheroids (6) along said longitudinal axis of said tube at different frequencies of the alternating current flow in order to obtain an impedance spectrum.

8. A method according to claim 7, wherein the introduction of said spheroid (6) is conducted by drawing in or pressing in by means of generating a difference in pressure in said culture medium (5).

9. A method according to one of the claims 7 or 8, wherein correct positioning of said spheroid (6) in said region (1) occurs by means of generating and measuring a direct current along said longitudinal axis of said tube in said region (1) during introduction of said spheroid (6).

10. A method according to one of the claims 7 to 9, wherein said to-be-characterized spheroid (6) is preselected according to size by means of a perforated screen.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer.
WO 01/23865 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 15/12,
C12M 1/34

ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstr. 54, D-80636
München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02753

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. August 2000 (12.08.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): THIELECKE, Hagen
[DE/DE]; Hasseler Chaussee 23, D-66386 St. Ingbert
(DE). ROBITZKI, Andrea [DE/DE]; Brunhildstr. 8,
D-68519 Viernheim (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: GAGEL, Roland; Landsberger Str. 480a,
D-81241 München (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 46 458.8 28. September 1999 (28.09.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US..

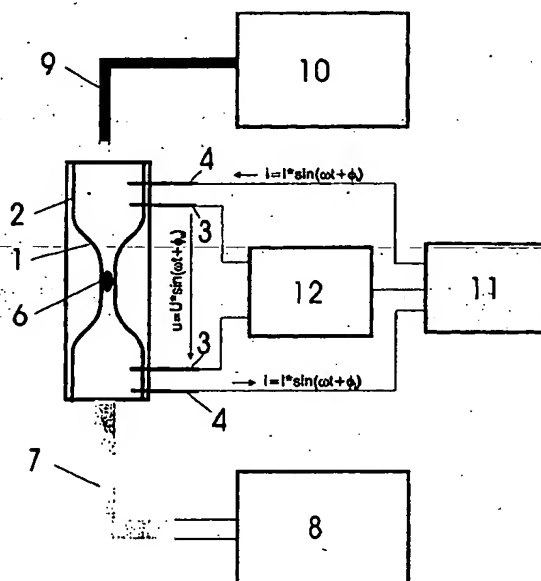
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-
nahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR CHARACTERIZING SPHEROIDS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON SPHÄROIDEN



(57) Abstract: The invention relates to a device and method for characterizing spheroids. The spheroid (6) to be characterized is introduced into a tube (1,2) consisting of an electrically insulating material and having an inner diameter that is smaller than the diameter of the spheroid (6) to be characterized, so that the spheroid is in continuous mechanical contact with the inner wall of the electrically insulating tube (1, 2). Electrodes (3, 4) are arranged in the tube on either side of the spheroid (6) and are able to produce a current flow through the spheroid (6). The resulting voltage drop on the spheroid can then be measured. The inventive arrangement and corresponding method provide a means of recording an impedance spectrum of spheroids with a considerable degree of sensitivity. In this way, the spheroids can be characterised quickly and without being damaged.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/23865 A1

**Veröffentlicht:**

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Charakterisierung von Sphäroiden. Hierbei wird der zu charakterisierende Sphäroid (6) in eine Röhre (1, 2) aus elektrisch isolierendem Material und mit einem Innendurchmesser eingebracht, der kleiner ist als der Durchmesser des zu charakterisierenden Sphäroiden (6), so dass dieser einen umlaufenden mechanischen Kontakt zur Innenwand der elektrisch isolierenden Röhre (1, 2) hat. Beidseitig des Sphäroiden (6) sind in der Röhre Elektroden (3, 4) angeordnet, über die ein Stromfluss durch den Sphäroiden (6) erzeugt und der resultierende Spannungsabfall am Sphäroiden gemessen werden kann. Die erfindungsgemäße Anordnung und das zugehörige Verfahren ermöglichen die Aufnahme eines Impedanzspektrums von Sphäroiden mit hoher Empfindlichkeit. Dadurch wird die schnelle und zerstörungsfreie Charakterisierung von Sphäroiden realisiert.

Vorrichtung und Verfahren zur Charakterisierung von
Sphäroiden

5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein
Verfahren zur Charakterisierung von Zellverbänden, die
unter Mikrogravitationsbedingungen aggregiert sind.
Unter Mikrogravitationsbedingungen aggregierte 3D-
Zellverbände, so genannte Sphäroide, können als Modelle
10 für gentechnologische und pharmakologische Frage-
stellungen verwendet werden.

Der Einsatz von Sphäroiden als Modelle für
pharmakologische und gentechnologische Fragestellungen
15 erfordert deren Charakterisierung hinsichtlich der
Wirkung von Pharmaka bzw. genetischen Manipulationen.

Zur Charakterisierung werden derzeit molekular-
biologische Methoden, wie beispielsweise Nukleinsäure-
hybridisierung oder Verwendung von Antikörpern, einge-
20 setzt. Die Auswertung erfolgt mittels Fluoreszenz-
Mikroskopie. Hierfür müssen jedoch mit hohem Aufwand
Schnittpräparate angefertigt werden.

Diese Methode der Charakterisierung von Sphäroiden
ist daher aufwendig und erfordert zu deren Auswertung
25 erfahrenes Fachpersonal. Ein gerade für den indus-
triellen Einsatz wünschenswerter hoher Durchsatz, die
Möglichkeit der Automatisierung und ein zerstörungs-
freies Charakterisieren sind mit den bisher bekannten
Methoden nicht möglich.

30

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht
darin, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur
Charakterisierung von Sphäroiden anzugeben, die einen

hohen Durchsatz, die Automatisierung sowie ein zerstörungsfreies Charakterisieren der Sphäroide ermöglicht.

5 Die Aufgabe wird mit der Vorrichtung und dem Verfahren nach Anspruch 1 bzw. Anspruch 7 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens und der Vorrichtung sind Gegenstand der Unteransprüche.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung beruhen auf der Charakterisierung der Sphäroide mittels Impedanz-Spektroskopie.

Bisher wurden Bio-Impedanzmessungen eingesetzt, um Gewebe- und Organschäden zu charakterisieren und zu
15 überwachen, für Hautstudien sowie für die Tumor- und Dentalforschung. Hierbei wurden beispielsweise Elektroden direkt mit dem Gewebe in Kontakt gebracht. Impedanz-Spektrogramme von kultivierten Zellverbänden wurden aufgenommen, indem Zellkulturen auf planaren
20 Elektrodensubstraten kultiviert wurden und die Impedanz zwischen den Elektroden bestimmt wurde, oder indem die Zellkulturen auf Filtermembranen kultiviert wurden und die Impedanz durch Zellschicht und Filtermembran bestimmt wurde (vgl. z.B. J. Wegener et al., J.
25 Biochem. Methods 32 (1996), 151-170). Ein derartiges Vorgehen ist mit Sphäroiden nicht möglich.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden Sphäroide in eine Röhre eingebracht, die zumindest in einem
30 Bereich ihrer Längsachse, im Folgenden als Positionierbereich bezeichnet, einen geringeren Innendurchmesser als die Durchmesser der zu charakterisierenden Sphäroide hat. Die Röhre besteht in diesem Positionier-

bereich entweder vollständig aus elektrisch
isolierendem Material oder weist an ihrem Innenumfang
elektrisch isolierende Eigenschaften auf, beispiels-
weise aufgrund einer Beschichtung mit einer
5 Isolationsschicht.

Die Röhre, beispielsweise eine Kapillare, wird
zunächst luftblasenfrei mit einem Kulturmedium gefüllt.
Anschließend wird der Sphäroid in den engen
Positionierbereich der Röhre eingebracht, so dass er
10 aufgrund des geringeren Innendurchmessers der Röhre in
diesem Bereich umlaufend mechanischen Kontakt zur
Innenwandung der Röhre aufweist. Anschließend wird über
eingebrachte Elektroden ein Stromfluss entlang der
Röhrenachse über das Kulturmedium und den Sphäroid
15 erzeugt und die über dem Sphäroid abfallende Spannung
gemessen. Aus Strom und Spannung wird die Impedanz
gebildet. Zur Aufnahme eines Impedanzspektrogramms wird
die Impedanz des Sphäroiden über einen in der Regel
zusammenhängenden Frequenzbereich erfasst.

20

Zwischen dem Impedanzspektrogramm und dem Aufbau
des Sphäroiden bzw. dessen Veränderung, beispielsweise
im Bereich der Zellmembran, des Zytoplasma oder des
intrazellulären Raumes, kann ein Zusammenhang
25 hergestellt werden, der der Charakterisierung des
Sphäroiden dient.

Die Impedanzspektroskopie an Sphäroiden wird bei
dem erfindungsgemäßen Verfahren gerade dadurch
ermöglicht, dass der Sphäroid einen umlaufenden
30 mechanischen Kontakt zur elektrisch isolierenden
Innenwandung der Röhre aufweist, so dass bei Einspeisen
eines Stromes kein Stromfluss über das Kulturmedium
oder andere Wege am Sphäroid vorbei möglich ist, der zu

Fehlmessungen führen würde. Der Strom fließt aufgrund dieser Anordnung in jedem Falle durch den Sphäroiden. Es können somit Impedanzen und Impedanzspektren von Sphäroiden mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden.

5 Dadurch wird die schnelle und zerstörungsfreie Charakterisierung dieser Sphäroide möglich. Insbesondere lassen sich aus den Impedanzspektren auch Parameter für automatische Testsysteme gewinnen, so dass der Test der Wirkung von Pharmaka und genetischen Manipulationen auf
10 Sphäroide mit einem hohen Durchsatz realisiert werden kann.

Die erfindungsgemäße Anordnung besteht aus der Röhre aus elektrisch isolierendem Material oder mit
15 einer entsprechenden Beschichtung - zumindest im Positionierbereich, und weist im Positionierbereich, an dem der Sphäroid bei der Messung positioniert wird, einen Innendurchmesser auf, der kleiner als der Durchmesser des zu charakterisierenden Sphäroiden ist.
20 Auf einer Seite dieses Bereiches ist ein erstes Elektrodenpaar mit einer inneren und einer äußeren Elektrode angeordnet. Auf der zweiten, in Richtung der Röhrenlängsachse gegenüberliegenden Seite des
Positionierbereiches ist ein zweites Elektrodenpaar mit
25 einer inneren und einer äußeren Elektrode angeordnet. Die innere Elektrode liegt jeweils näher am Positionierbereich als die äußere Elektrode. Die Elektroden können hierbei am Innenumfang der Röhre angebracht sein oder sich in das Innenvolumen der Röhre
30 erstrecken.

Die Vorrichtung weist weiterhin eine Messanordnung zur Einspeisung eines Wechselstromes zwischen den beiden äußeren Elektroden und zur Erfassung einer

resultierenden Wechselspannung zwischen den beiden inneren Elektroden auf. Alle Elektroden müssen hierbei selbstverständlich von außerhalb der Röhre kontaktierbar sein. Die Messanordnung kann beispielsweise aus
5 einem kommerziell erhältlichen Impedanz-Analyzer bestehen.

Die erfindungsgemäße Anordnung ermöglicht die schnelle und zerstörungsfreie Charakterisierung von
10 Sphäroiden. Durch die Anordnung mit dem geringen Röhrendurchmesser zur Positionierung der Sphäroide und den beidseitig in Längsrichtung der Röhre angeordneten Elektrodenpaaren haben die Shunt-Wege einen sehr hohen Widerstand und der Einfluss der Elektrodenpolarisation
15 kann aufgrund der Anordnung der getrennten Elektroden für die Erzeugung des Stromflusses und die Messung der Spannung vernachlässigt werden. Gerade hierdurch ist es möglich, die Impedanz von Sphäroiden mit hoher Empfindlichkeit zu bestimmen, die in der Regel einen geringen
20 Widerstand aufweisen.

Es versteht sich von selbst, dass für die Durchführung der Messung der Durchmesser der Röhre an den Durchmesser der Sphäroiden angepasst sein muss - oder
25 umgekehrt, da zu kleine Sphäroide keinen umlaufenden Kontakt zur Innenwandung der Röhre aufweisen würden. Die Größe von Sphäroiden liegt in der Regel im Bereich zwischen 0,1 und 0,5 mm, so dass der Durchmesser der Röhre im gleichen Bereich liegen muss.

30 Für die Charakterisierung von Sphäroiden unterschiedlicher Größe werden vorzugsweise mehrere Röhren mit unterschiedlichem Durchmesser zur Verfügung gestellt. Die einzelnen Sphäroide können hierbei

beispielsweise über ein Lochraster in der Größe vorselektiert werden. Dies gewährleistet eine jeweils reproduzierbare Messung, bei der die Sphäroide in der Röhre jeweils in gleichem Maße zusammengepresst werden.

5

Vorzugsweise weist die Röhre auf einer oder beiden Seiten des Positionierbereichs eine trichterförmige Aufweitung auf, die das einfache und schnelle Einbringen der Sphäroide ohne Beschädigung in den Positionierbereich ermöglicht. Die Elektroden sind hierbei vorzugsweise in dem trichterförmig aufgeweiteten Bereich angeordnet und erstrecken sich radial in die Röhre hinein. Durch die Aufweitung in diesem Bereich wird das Einbringen der Sphäroide nicht durch die Elektroden behindert.

15

Zur Positionierung der Sphäroide in der Röhre werden diese vorzugsweise über eine auf das Kulturmedium einwirkende Pumpe in die Röhre hineingepresst oder gesaugt. Die Kontrolle der richtigen Position kann hierbei auf optischem Wege erfolgen.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform wird bei dem Positioniervorgang jedoch ein Stromfluss über die Elektroden erzeugt und der resultierende Widerstand

gemessen. Bei korrekter Positionierung der Sphäroide steigt dieser Widerstand stark an. Diese Kontrolle kann beispielsweise über die Messung des Gleichstromwiderstandes erfolgen.

25

Selbstverständlich ist es auch möglich, die Röhre im Positionierbereich selbst trichterförmig auszugestalten, so dass mit einer Röhre Sphäroide mit unterschiedlichem Durchmesser charakterisiert werden

30

können, die sich an unterschiedlichen Stellen des trichterförmigen Positionierbereichs der Röhre festsetzen. Hierbei besteht allerdings das Problem der Reproduzierbarkeit, da die Stärke des Zusammenpressens der Sphäroide und damit deren Länge bzw. Widerstand entlang der Röhrenachse vom Anpressdruck abhängt. Dieses Problem lässt sich mit einem konstanten Röhrendurchmesser vermeiden.

In einer weiteren Ausführungsform ist eine Röhre vorgesehen, bei der sich der Innendurchmesser im Positionierbereich entlang der Längsachse in Stufen ändert. Hierdurch lassen sich ebenfalls Sphäroide verschiedener Größe fixieren.

Durch die erfindungsgemäße Anordnung und das zugehörige Verfahren lässt sich ein Sphäroid in sehr kurzer Zeit vermessen. Die Impedanzmessung lässt sich in weniger als 1 Sekunde durchführen. Die Zeit für die Positionierung liegt im Bereich weniger Minuten oder darunter.

Insbesondere für den industriellen Einsatz ist eine arrayförmige Anordnung einer Vielzahl der erfindungsgemäßen Vorrichtungen von Vorteil, die beispielsweise unterschiedliche Durchmesser aufweisen

können. Hierdurch lassen sich eine Vielzahl von Sphäroiden parallel charakterisieren. Weiterhin ermöglicht der Einsatz von Röhren mit konstantem Querschnitt über den Positionierbereich das Einbringen der Sphäroide von einer Seite der Röhre und das Ausstoßen der Sphäroide nach der Messung auf der gegenüberliegenden Seite der Röhre, so dass in automatischen Messsystemen ein kontinuierlicher Durchsatz erreicht werden kann.

Ein bevorzugtes Einsatzgebiet des vorliegenden Verfahrens bzw. der zugehörigen Vorrichtung liegt im Bereich der (Chemo-)Therapeutika-Testung

5 (Pharmakologie, Pharmakokinetik; Nebenwirkungen) und ihrer Wirkmechanismen. So lässt sich damit beispielsweise der Nachweis gentherapeutischer Ansätze an Krebs-Tumorsphäroiden durchführen. Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie unter Einsatz des vorliegenden
10 Verfahrens bzw. der Vorrichtung mit positioniertem genmanipuliertem Tumorzellsphäroid können morphologische Veränderungen, Disintegration des Gewebes sowie Zunahme nekrotischer Areale anhand von Impedanzänderungen der Zellmembran in kürzester Zeit
15 reproduzierbar bestimmt werden. Der Einsatz der vorliegenden Vorrichtung stellt somit ein rasches und effizientes Nachweisverfahren bezüglich der Wirksamkeit von Genkonstrukten für den Einsatz in der Tumor-Gentherapie bereit.

20

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen in Verbindung mit den Zeichnungen nochmals erläutert. Hierbei zeigen:

-
- 25 Fig. 1: eine Schnittdarstellung eines Ausschnitts einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit positioniertem Sphäroid;
- Fig. 2: die schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Charakterisierung von
30 Sphäroiden mittels Impedanzspektroskopie; und

Fig. 3a/b: in Schnittdarstellung zwei weitere Beispiele der geometrischen Form der Röhre der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

5 In diesem Ausführungsbeispiel besteht die erfindungsgemäße Vorrichtung aus einer Röhre mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm im Positionierbereich des Sphäroiden und einem Innendurchmesser von 4 mm außerhalb dieses Positionierbereichs. Eine derartige Röhre, wie sie in Fig. 1 dargestellt ist, lässt sich aus einer engen Kapillare 1 aus isolierendem Material, wie z.B. Glas, herstellen, an die beidseitig Glasröhren 2 mit größerem Durchmesser angeschmolzen werden.

10 Im vorliegenden Beispiel haben die Kapillare eine Länge von 8 mm und die Glasröhrchen eine Länge von 40 mm. Der Übergang der Innendurchmesser von Glasröhrchen 2 und Glaskapillare 1 verläuft trichterförmig.

In den beiden angeschmolzenen Glasröhrchen 2 ist jeweils beidseitig vom Positionierbereich in einem Abstand von 15 mm zur Mitte dieses Bereiches eine erste Bohrung und in einem Abstand von 20 mm zur Mitte dieses Bereiches eine zweite Bohrung eingebracht. Die Bohrungen haben einen Durchmesser von 0,4 mm. In die Bohrungen sind vier Platindrähte 3, 4 mit einer Länge von 10 cm und einem Durchmesser von 0,3 mm eingeklebt.

25 Die Platindrähte bilden die äußeren Elektroden 4 bzw. die inneren Elektroden 3 für die Aufnahme des Impedanzspektrogramms. Es versteht sich von selbst, dass die hier angegebenen Abstände der Elektroden zum Zentrum der Röhre nur beispielhaft zu verstehen sind, und auf die Messung keinen wesentlichen Einfluss haben. Ebenso können die Elektroden auch in anderer Weise,

beispielsweise als Beschichtung, in der Röhre angeordnet werden.

Fig. 1 zeigt weiterhin das in die Röhre luft-
blasenfrei eingefüllte Kulturmedium 5 sowie den
positionierten, in den Positionierbereich eingepressten
Sphäroid 6. Zur Durchführung der Messung werden die
beiden äußeren Elektroden 4 mit einem Wechselstrom
beaufschlagt. Die über das Sphäroid 6 abfallende
Wechselspannung wird mit den beiden inneren Elektroden
3 erfasst.

Fig. 2 zeigt schematisch ein Beispiel für die
vollständige erfindungsgemäße Vorrichtung. In dieser
Figur sind wiederum der enge Positionierbereich der
Glaskapillare 1, die beiden äußeren Glasröhrchen 2 mit
einem größeren Innendurchmesser sowie die äußeren 4 und
inneren Elektroden 3 zu erkennen. Zum Einbringen des
Sphäroiden wird der Glaskörper 1,2 mit den Elektroden
an einer Halterung befestigt. Die untere Öffnung des
Glasrohrs wird über einen mit Kulturmedium 5 gefüllten
Schlauch 7 - im vorliegenden Fall mit einer Länge von
20 cm und einem Innendurchmesser von 5 mm - an ein
Feinregelventil 8 mit Druckablassventil angeschlossen.

Über das Feinregelventil wird das Kulturmedium so
lange aus dem Schlauch in den Glaskörper 1,2 gedrückt,
bis der Glaskörper vollständig mit dem Kulturmedium 5
gefüllt ist. Anschließend wird der zu charakterisieren-
de Sphäroid 6 durch die obere Öffnung des Glaskörpers
in das Kulturmedium 5 eingebracht. Anschließend wird an
die obere Öffnung des Glaskörpers ein mit Öl gefüllter
Schlauch 9 angeschlossen. Der mit Öl gefüllte Schlauch
ist mit seinem anderen Ende an einen beweglichen Kolben

10 angeschlossen. Danach wird das Druckablassventil 8 geöffnet. Wenn der Sphäroid 6 durch die Schwerkraft in den trichterförmigen Übergang von Glasrohr 2 und Kapillare 1 gesunken ist, wird der Sphäroid durch
5 geeigneten Betrieb des beweglichen Kolbens 10 zentral positioniert. Die zentrale Position ist in der Figur zu erkennen. Zur Positionierung des Sphäroiden werden durch den beweglichen Kolben über den ölgefüllten Schlauch Druckunterschiede in der Kapillare erzeugt.
10 Nach der Positionierung verbleibt der Sphäroid 6 in der entsprechenden Position, in die er gepresst wurde.

Die vier Platinelektroden 3, 4 werden an einen Impedanz-Analyzer, bestehend aus einer Stromquelle 11
15 und einem Spannungsmesser 12, angeschlossen. Über die außen liegenden Elektroden 4 wird ein Strom $i = I \cdot \sin(\omega t + \varphi_i)$ eingespeist, der so geregelt wird, dass der Spannungsabfall $u = U \cdot \sin(\omega t + \varphi_u)$ über die innen liegenden Elektroden 3 etwa 10 mV beträgt.
20 Diese Wechselspannung wird über den Spannungsmesser 12 erfasst. Aus Strom und Spannung werden vom Impedanz-Analyzer der Betrag und die Phase der Impedanz gebildet. Um das charakteristische Impedanzspektrum des Sphäroiden 6 zu erhalten, werden die Impedanzen über
25 den Frequenzbereich von 20 Hz bis 1 MHz bestimmt.

Die Figuren 3a und 3b zeigen zwei weitere Beispiele für die geometrische Form der Röhre der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Der Röhrenquerschnitt
30 ändert sich über den Positionierbereich 1 stufenförmig. Bei der Ausgestaltung der Figur 3b sind zusätzlich Wölbungen vorgesehen, die die Änderung der Position der Sphäroide 6 während der Messung verhindert, wenn

beispielsweise unbeabsichtigt über die den Sphäroiden umgebende Flüssigkeit leichte Kräfte auf den Sphäroiden wirken.

- Beide Ausführungsformen erlauben die Aufnahme von
- 5 Sphäroiden 6 unterschiedlicher Größe, wie aus den Figuren deutlich zu erkennen ist. Selbstverständlich wird bei der Messung jeweils nur ein Sphäroid in der Röhre fixiert. Die in den Figuren zu erkennenden drei Sphäroide 6 sind in diesem Beispiel nur zur
- 10 Veranschaulichung gleichzeitig dargestellt. Eine Vorselektion der Sphäroide nach der Größe ist bei dieser Form der Röhren nicht erforderlich. Die Kontrolle der richtigen Positionierung kann
- 15 beispielsweise optisch oder elektrisch erfolgen, wie dies bereits weiter oben erläutert wurde.
-

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Charakterisierung von Sphäroiden, bestehend aus

- 5 - einer Röhre (1, 2), die in einem Bereich (1) ihrer Längsachse einen Innendurchmesser aufweist, der kleiner als der Durchmesser der zu charakterisierenden Sphäroide (6) ist, wobei die Röhre in dem Bereich (1) zumindest an ihrem Innenumfang aus elektrisch isolierendem Material besteht;
- 10 - einem ersten Elektrodenpaar (3,4) in der Röhre (2) auf einer ersten Seite des Bereichs (1) und einem zweiten Elektrodenpaar (3, 4) in der Röhre (2) auf einer zweiten Seite des Bereichs (1), die der ersten Seite gegenüberliegt, wobei jedes Elektrodenpaar
- 15 (3,4) eine innere Elektrode (3) und eine äußere Elektrode (4) aufweist, von denen die innere Elektrode (3) näher an dem Bereich (1) liegt als die äußere Elektrode (4); und
- einer Messanordnung (11, 12) mit einer Stromquelle
- 20 ~~(11), die mit den äußeren Elektroden (4) verbunden~~ ist, und einem Spannungsmesser (12), der mit den inneren Elektroden (3) verbunden ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
25 dadurch gekennzeichnet,
dass die Röhre (1,2) auf einer Seite oder beidseitig des Bereichs (1) eine trichterförmige Aufweitung aufweist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass sich die Elektroden (3,4) radial in die Röhre (2)
erstrecken.

5

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Röhre (1, 2) in dem Bereich (1) einen
Innendurchmesser zwischen 0,1 und 0,5 mm aufweist.

10

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Röhre (1, 2) aus Glas besteht.

15

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass sich der Innendurchmesser der Röhre (1,2) in dem
Bereich (1) stufenförmig ändert.

20

7. Verfahren zur Charakterisierung von Sphäroiden mit
folgenden Schritten:

- Bereitstellen einer Röhre (1, 2), die in einem
Bereich (1) einen Innendurchmesser aufweist, der
~~kleiner als der Durchmesser der zu~~

25

charakterisierenden Sphäroide ist, wobei die Röhre
in dem Bereich (1) zumindest an ihrem Innenumfang
aus elektrisch isolierendem Material besteht;

- Auffüllen der Röhre (1, 2) mit einem flüssigen
Kulturmedium (5);

30

- Einbringen eines Sphäroiden (6) in den Bereich (1)
der Röhre (1, 2), so dass dieser einen umlaufenden
mechanischen Kontakt zur Innenwandung des Bereichs
(1) der Röhre (1, 2) aufweist;

- Erzeugen eines Wechselstromflusses im Kulturmedium (5) entlang der Längsachse der Röhre über den Sphäroiden (6); und
- Messung der über den Sphäroiden (6) entlang der Längsachse der Röhre abfallenden Wechselspannung.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet,

10 dass das Einbringen des Sphäroiden (6) mittels Ansaugen oder Einpressen durch Erzeugen eines Druckunterschiedes im Kulturmedium (5) durchgeführt wird.

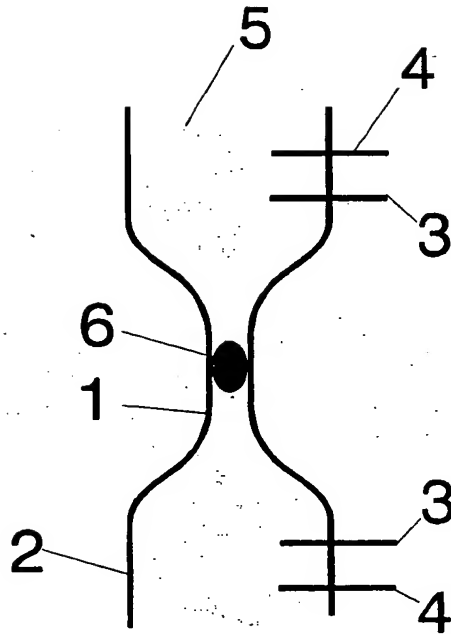
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet,

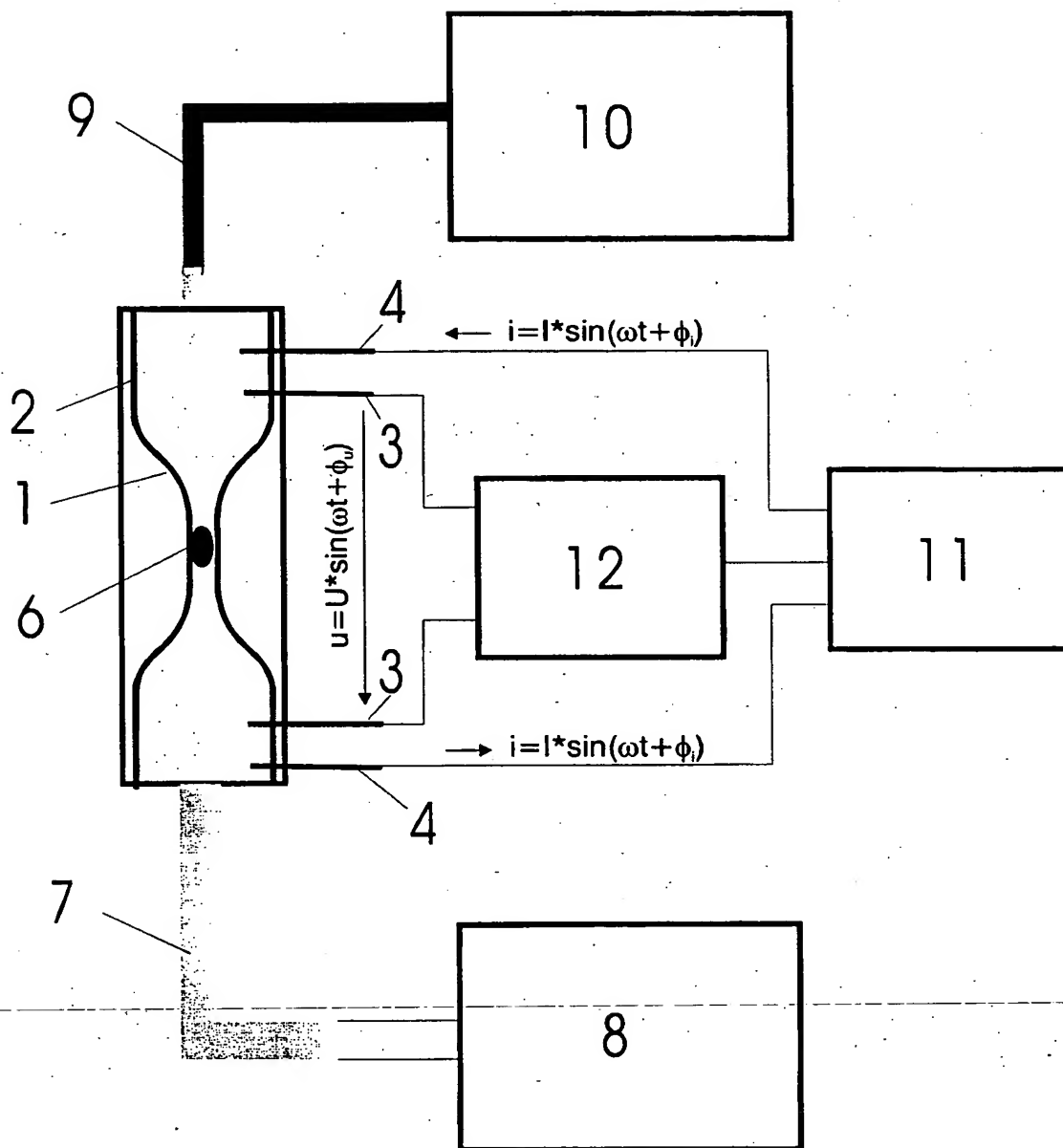
15 dass eine korrekte Positionierung des Sphäroiden (6) in dem Bereich (1) über die Erzeugung und Messung eines Gleichstromes entlang der Längsachse der Röhre im Bereich (1) während des Einbringens des Sphäroiden (6) erfolgt.

20 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet,

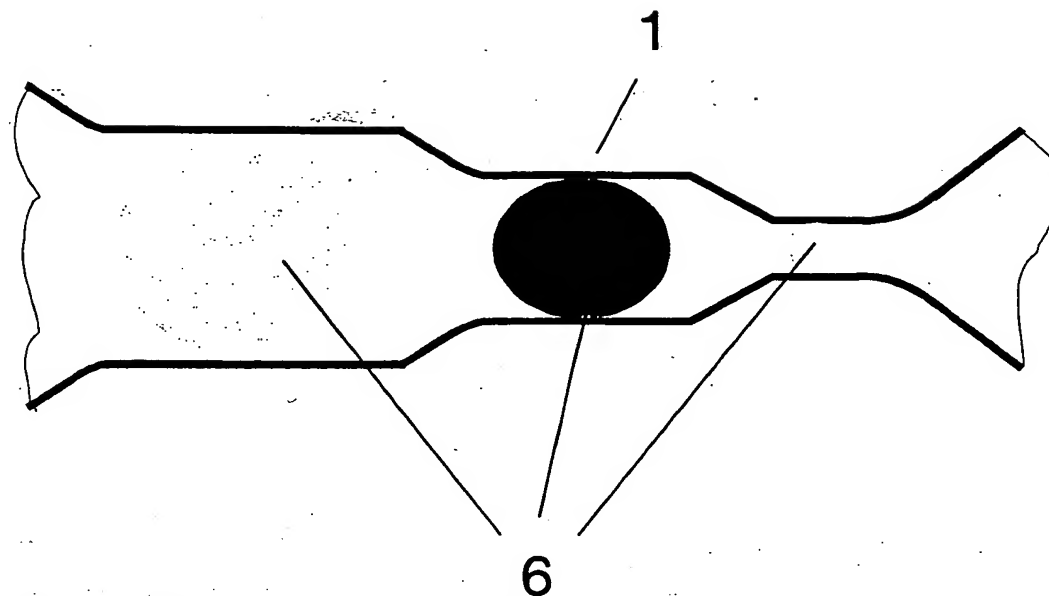
dass zu charakterisierende Sphäroide (6) vor dem Einbringen über ein Lochraster in der Größe

25 vorselektiert werden.

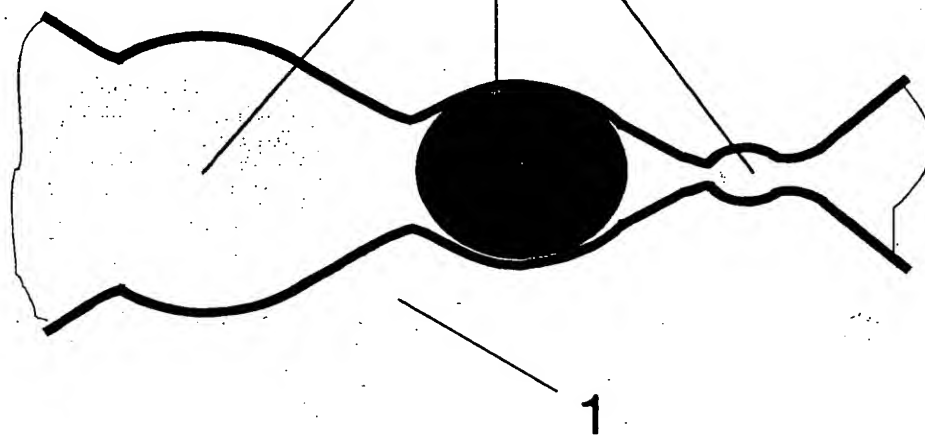
Figur 1

Figur 2

3/3



Figur 3a



Figur 3b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.
PCT/D/00/02753

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N15/12 C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 055 799 A (COSTER HANS ET AL) 25 October 1977 (1977-10-25) column 2, line 25 -column 3, line 20	1,2
A	column 3, line 45 -column 4, line 27	7
A	US 4 926 114 A (DOUTRE DON A) 15 May 1990 (1990-05-15) abstract; figures 3,5	2
A	US 4 778 657 A (SPOHR REIMAR) 18 October 1988 (1988-10-18) abstract; figure 2	3
A	GB 2 232 769 A (FISHER TIMOTHY CHARLES ; FISHER DR TIMOTHY CHARLES (US)) 19 December 1990 (1990-12-19) abstract; figure 1	6

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 October 2000

Date of mailing of the international search report

02/11/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/DE 90/02753

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4055799 A	25-10-1977	DE 2502621 A CH 594888 A FR 2298797 A JP 1297867 C JP 51097495 A JP 60013140 B	05-08-1976 31-01-1978 20-08-1976 20-01-1986 27-08-1976 05-04-1985
US 4926114 A	15-05-1990	AU 588022 B AU 5409586 A BR 8600817 A CA 1325243 A DE 3680359 D EP 0193394 A ES 552417 D ES 8800753 A JP 61205844 A NO 860720 A, B,	07-09-1989 04-09-1986 04-11-1986 14-12-1993 29-08-1991 03-09-1986 16-11-1987 01-02-1988 12-09-1986 28-08-1986
US 4778657 A	18-10-1988	DE 3626600 A	19-03-1987
GB 2232769 A	19-12-1990	NONE	

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 990809PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02753	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 12/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 28/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N15/12		
Anmelder FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWAND		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 04/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 06.02.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Bravin, M Tel. Nr. +49 89 2399 2417 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

2,3,5-12 ursprüngliche Fassung

1,1a,4 eingegangen am 19/07/2001 mit Schreiben vom 18/07/2001

Patentansprüche, Nr.:

2-6 ursprüngliche Fassung

1,7-10 eingegangen am 19/07/2001 mit Schreiben vom 18/07/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02753

- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).
siehe Beiblatt

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	4, 7-10
	Nein: Ansprüche	1-3,5,6
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-10
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Die mit Schreiben vom 18.07.2001 eingereichten Änderungen bringen Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34(2)(b) PCT über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen.

Es handelt sich dabei um die im Anspruch 1, Z. 24, bzw. in der Beschreibung, S. 4, Z. 14, eingeführten Bezeichnungen "vertikal angeordnet" bezüglich einer bestimmten Röhre.

Tatsächlich geht lediglich aus der ursprünglichen Anmeldung hervor, dass ein "Sphäroid" (6, Fig. 2) durch die Schwerkraft von einem beweglichen Kolben (10, Fig. 2) in die Röhre (1, 2, Fig. 2) eingebracht wird, und zwar mit Hilfe eines Schlauchs (9, Fig. 2), der den Kolben und die Röhre verbindet. Danach wird der Sphäroid mittels Druckunterschieden, die durch geeigneten Betrieb des Kolbens erzeugt werden, in der Röhre zentral positioniert (vergl. S. 11, Z. 2-11). Auch wenn damit klar ist, dass ein bestimmter Höhenunterschied zwischen dem Kolben und der Röhre notwendig ist, heißt das nicht, dass die Röhre unbedingt vertikal angeordnet sein muß. Dieses letzte Merkmal wird nirgendwo in der ursprünglichen Anmeldung genannt oder eindeutig erwähnt (insb. folgt dieses Merkmal nicht aus den auf Fig. 1-3 schematisch dargestellten Ausführungsbeispielen, da die Richtung der Schwerkraft niemals definiert wird).

Die obengenannten Änderungen wurden daher im folgenden nicht berücksichtigt. Insbesondere beziehen sich die folgenden Angaben auf den Anspruch 1, der im Anmeldezeitpunkt eingereicht wurde.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) PCT hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1.

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: US-A-4 055 799 (COSTER HANS ET AL) 25. Oktober 1977 (1977-10-25)

D2: US-A-5 691 633 (LIU ET AL) 25. November 1997 (1997-11-25)

(Dokument D2 wurde im internationalen Recherchenbericht nicht angegeben).

2.

Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist aus folgenden Gründen nicht neu (Art. 33(2) PCT):

Dokument D1 veröffentlicht eine Vorrichtung (siehe **Fig. 1**, D1) zur Charakterisierung von "Sphäroiden" (z.B. individuellen Zellen, Zellverbänden, usw. - siehe Zusammenfassung und Sp. 2, Z. 59- Sp. 3, Z. 4, sowie 12, Fig. 12, D1), bestehend aus:

- einer Röhre (7, 3, 9, 4, 8), die in einem Bereich (9) ihrer Längsachse einen Innendurchmesser aufweist, der kleiner als der Durchmesser der zu charakterisierenden "Sphäroide" (12) ist, wobei die Röhre in dem Bereich (9) aus elektrisch isolierendem Material (2) besteht (siehe Sp. 3, Z. 43-52, D1);

- einem ersten Elektrodenpaar (5, 6) in der Röhre auf einer ersten Seite (3) des Bereichs (9) und einem zweiten Elektrodenpaar (5, 6) in der Röhre auf einer zweiten Seite (4) des Bereichs (9), die der ersten Seite gegenüberliegt, wobei jedes Elektrodenpaar (5, 6) eine innere Elektrode (6) und eine äussere Elektrode (5) aufweist, von denen die innere Elektrode (6) näher an dem Bereich (9) liegt als die äussere Elektrode (5); und

- einer Messanordnung (siehe **Fig. 3**, D1) mit einer Stromquelle (13), die mit den äusseren Elektroden (5) verbunden ist, und einem Spannungsmesser (15), der mit den inneren Elektroden (6) verbunden ist (siehe Sp. 6, Z. 7-14, D1).

Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist somit aus D1 bekannt (Art. 33(2) PCT).

3.

Der Gegenstand des Anspruchs 7 ist aus folgenden Gründen nicht erfinderisch (Art. 33(3) PCT):

3.1

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 7 angesehen wird, offenbart ein Verfahren zur Charakterisierung von "Sphäroiden" (z.B. individuellen Zellen, Zellverbänden, usw. - siehe Zusammenfassung und Sp. 2, Z. 59- Sp. 3, Z. 4, sowie 12, Fig. 1-2, D1) mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen einer Röhre (7, 3, 9, 4, 8, Fig. 1, D1), die in einem Bereich (9, Fig. 1, D1) einen Innendurchmesser aufweist, der kleiner als der Durchmesser der zu charakterisierenden Sphäroide ist, wobei die Röhre in dem Bereich (9, Fig. 1, D1) zumindest an ihrem Innenumfang aus elektrisch isolierendem Material (2, Fig. 1-2, D1) besteht (siehe Sp. 3, Z. 43-52, D1);
- Auffüllen der Röhre mit einem flüssigen Kulturmedium (siehe Sp. 6, Z. 19-21, D1);
- Einbringen eines Sphäroiden (12, Fig. 1, D1) in den Bereich (9, Fig. 1-2, D1) der Röhre, so dass dieser einen umlaufenden mechanischen Kontakt zur Innenwandung des Bereichs der Röhre aufweist (siehe Sp. 6, Z. 22-25 und Sp. 3, Z. 65-68, D1).

3.2

Der Gegenstand des Anspruchs 7 unterscheidet sich von D1 durch folgende Schritte:

- Erzeugen eines Wechselstromflusses im Kulturmedium entlang der Längsachse der Röhre über den Sphäroiden; und
- Messung der über den Sphäroiden entlang der Längsachse der Röhre abfallenden Wechsellspannung bei unterschiedlichen Frequenzen des Wechselstromflusses, um ein Impedanzspektrum zu erhalten.

Mit Hinblick auf die Beschreibung (S. 5, Z. 4-6) entsprechen diese Schritte beispielsweise dem Einsatz eines kommerziell erhältlichen Impedanz-Analysers.

3.3

Im Gegensatz dazu wird in D1 eine Pulstechnik mit in der Amplitude ansteigenden Strohmpulsen eingesetzt, um die Durchbruchspannung der Zellen zu ermitteln.

Dadurch wird keine Spektral-Information ermittelt, was auch explizit im Dokument D2, das die Charakterisierung von Zellen ebenfalls betrifft, erwähnt wird (siehe Sp. 2, Z. 18-30, D2).

3.4

Allerdings geht aus D2 klar hervor, dass die Ermittlung eines Impedanz-Spektrums einen vorteilhaften Vorgang zur Charakterisierung von Zellen darstellt, und im Stand der Technik bereits verwendet wird (vergl. z. B. Sp. 1, Z. 21-26 und Sp. 45-47, D2).

3.5

Die mit dem vorliegenden Anmeldung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, dass ein Verfahren angegeben wird, um ein Impedanz-Spektrum von bestimmten "Sphäroiden" (12, Fig. 1-2, D1) zu ermitteln, die in entsprechenden Verjüngungen (9, Fig. 1-2, D1) in einer Vorrichtung gemäß D1 angebracht sind.

3.5

Der Einsatz eines mit den Elektroden (5, 6, Fig. 1-2, D1) angepasst gekoppelten kommerziellen Impedanz-Analysers ist eine von mehreren naheliegenden Möglichkeiten, aus denen der Fachmann den Umständen entsprechend auswählen würde, um die gestellte Aufgabe zu lösen. Der Fachmann würde damit ohne erfinderisches Zutun zu den Merkmalen des Anspruchs 7 gelangen (siehe obigen Punkt 3.2).

Anspruch 7 erfüllt daher nicht die Erfordernisse des Art. 33(3) PCT.

4.

Die abhängigen Ansprüche 2-6, 8-10 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT-Übereinkommens in Bezug auf Neuheit bzw. erfinderische Tätigkeit erfüllen. Die Gründe dafür sind die folgenden:

4.1

Der Gegenstand der Ansprüche 2, 3, 5, 6 ist nicht neu (Art. 33(2) PCT):

Anspruch 2 : siehe Fig. 1, D1, wobei die rechte Seite des Bereichs (9) eine trichterförmige Aufweitung aufweist.

Anspruch 3 : siehe Fig. 1, D1, wobei sich die Elektroden (5, 6) radial in Bezug auf die Teilstücke (7, 8), bzw die Teilstücke (3, 4), der Röhre erstrecken.

Anspruch 5 : siehe Sp. 5, Z. 42-46, D1.

Anspruch 6 : siehe Fig. 1, D1.

4.2

Der Gegenstand der Ansprüche 4, 8-10 weist keinen erfinderischen Schritt auf (Art. 33(3) PCT):

Anspruch 4 : im Hinblick auf den in D1 erwähnten Zelldurchmesserbereich (siehe Sp. 3, Z. 22-25, D1) definiert Anspruch 4 eine offensichtliche Auswahl von Innendurchmessern für die Verjüngungen (9, Fig. 1-2, D1).

Anspruch 8 : siehe Sp. 6, Z. 22-25, D1.

Anspruch 9 : das in Anspruch 9 definierte Merkmal entspricht einer Widerstandsmessung (Beschreibung, S. 6, Z. 22-28), die gegenüber D1 nicht erfinderisch ist (siehe Sp. 4, Z. 15-21, D1).

Anspruch 10: siehe Sp. 4, Z. 1-5 und Filter 10, Fig. 2, D1.

Vorrichtung und Verfahren zur Charakterisierung von
Sphäroiden

5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein
Verfahren zur Charakterisierung von Zellverbänden, die
unter Mikrogravitationsbedingungen aggregiert sind.
Unter Mikrogravitationsbedingungen aggregierte 3D-
Zellverbände, so genannte Sphäroide, können als Modelle
10 für gentechnologische und pharmakologische Frage-
stellungen verwendet werden.

Der Einsatz von Sphäroiden als Modelle für
pharmakologische und gentechnologische Fragestellungen
15 erfordert deren Charakterisierung hinsichtlich der
Wirkung von Pharmaka bzw. genetischen Manipulationen.

Zur Charakterisierung werden derzeit molekular-
biologische Methoden, wie beispielsweise Nukleinsäure-
hybridisierung oder Verwendung von Antikörpern, einge-
20 setzt. Die Auswertung erfolgt mittels Fluoreszenz-
Mikroskopie. Hierfür müssen jedoch mit hohem Aufwand
Schnittpräparate angefertigt werden.

Diese Methode der Charakterisierung von Sphäroiden
ist daher aufwendig und erfordert zu deren Auswertung
25 erfahrenes Fachpersonal. Ein gerade für den indus-
triellen Einsatz wünschenswerter hoher Durchsatz, die
Möglichkeit der Automatisierung und ein zerstörungs-
freies Charakterisieren sind mit den bisher bekannten
Methoden nicht möglich.

30

Aus der US 4,055,799 ist eine Vorrichtung gemäß
dem Oberbegriff des Patenanspruches 1 sowie ein
Verfahren zur Erfassung der elektrischen und dielek-

- 1a -

- trischen Eigenschaften der Zellmembran von einzelnen lebenden Zellen oder von lebenden Zellen in einer schichtartigen Anordnung mit einer derartigen Vorrichtung bekannt. Bei dem Verfahren werden die
- 5 dielektrischen Eigenschaften der Zellmembran einzelner Zellen dadurch bestimmt, dass die Zellen mit Spannungspulsen steigender Amplitude beaufschlagt werden, bis die Durchbruchspannung der Zellmembran erreicht ist. Die Höhe der Durchbruchspannung wird mit
- 10 den Messelektroden erfasst. Aus der Höhe dieser Durchbruchspannung können Informationen über die elastischen und dielektrischen Eigenschaften der Zellmembran abgeleitet werden. Die hierfür erforderlichen Messzeiten lassen jedoch keinen
- 15 ausreichend hohen Durchsatz zu. Weiterhin ist nicht ersichtlich, in welcher Weise dieses Verfahren zur Charakterisierung von Sphäroiden eingesetzt werden könnte.
- 20 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Charakterisierung von Sphäroiden anzugeben, die einen

Fehlmessungen führen würde. Der Strom fließt aufgrund dieser Anordnung in jedem Falle durch den Sphäroiden. Es können somit Impedanzen und Impedanzspektren von Sphäroiden mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden.

5 Dadurch wird die schnelle und zerstörungsfreie Charakterisierung dieser Sphäroide möglich. Insbesondere lassen sich aus den Impedanzspektren auch Parameter für automatische Testsysteme gewinnen, so dass der Test der Wirkung von Pharmaka und genetischen Manipulationen auf

10 Sphäroide mit einem hohen Durchsatz realisiert werden kann.

Die erfindungsgemäße Anordnung besteht aus der vertikal angeordneten Röhre aus elektrisch isolierendem

15 Material oder mit einer entsprechenden Beschichtung - zumindest im Positionierbereich, und weist im Positionierbereich, an dem der Sphäroid bei der Messung positioniert wird, einen Innendurchmesser auf, der kleiner als der Durchmesser des zu charakterisierenden

20 Sphäroiden ist. Auf einer Seite dieses Bereiches ist ein erstes Elektrodenpaar mit einer inneren und einer äußeren Elektrode angeordnet. Auf der zweiten, in Richtung der Röhrenlängsachse gegenüberliegenden Seite

des Positionierbereiches ist ein zweites Elektrodenpaar

25 mit einer inneren und einer äußeren Elektrode angeordnet. Die innere Elektrode liegt jeweils näher am Positionierbereich als die äußere Elektrode. Die Elektroden können hierbei am Innenumfang der Röhre angebracht sein oder sich in das Innenvolumen der Röhre

30 erstrecken.

Die Vorrichtung weist weiterhin eine Messanordnung zur Einspeisung eines Wechselstromes zwischen den beiden äußeren Elektroden und zur Erfassung einer

Neue Patentansprüche 1 und 7 bis 10

1. Vorrichtung zur Charakterisierung von Sphäroiden, bestehend aus

- 5 - einer Röhre (1, 2), die in einem Bereich (1) ihrer Längsachse einen Innendurchmesser aufweist, der kleiner als der Durchmesser der zu charakterisierenden Sphäroide (6) ist, wobei die Röhre in dem Bereich (1) zumindest an ihrem Innenumfang aus elektrisch isolierendem Material besteht;
- 10 - einem ersten Elektrodenpaar (3,4) in der Röhre (2) auf einer ersten Seite des Bereichs (1) und einem zweiten Elektrodenpaar (3, 4) in der Röhre (2) auf einer zweiten Seite des Bereichs (1), die der ersten Seite gegenüberliegt, wobei jedes Elektrodenpaar
- 15 (3,4) eine innere Elektrode (3) und eine äußere Elektrode (4) aufweist, von denen die innere Elektrode (3) näher an dem Bereich (1) liegt als die äußere Elektrode (4); und
- 20 - einer Messanordnung (11, 12) mit einer Stromquelle (11), die mit den äußeren Elektroden (4) verbunden ist, und einem Spannungsmesser (12), der mit den inneren Elektroden (3) verbunden ist;

dadurch gekennzeichnet,
dass die Röhre (1, 2) vertikal angeordnet ist.

25

7. Verfahren zur Charakterisierung von Sphäroiden mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen einer Röhre (1, 2), die in einem Bereich (1) einen Innendurchmesser aufweist, der kleiner als der Durchmesser der zu charakterisierenden Sphäroide ist, wobei die Röhre in dem Bereich (1) zumindest an ihrem Innenumfang aus elektrisch isolierendem Material besteht;
- Auffüllen der Röhre (1, 2) mit einem flüssigen Kulturmedium (5);
- Einbringen eines Sphäroiden (6) in den Bereich (1) der Röhre (1, 2), so dass dieser einen umlaufenden mechanischen Kontakt zur Innenwandung des Bereichs (1) der Röhre (1, 2) aufweist;
- Erzeugen eines Wechselstromflusses im Kulturmedium (5) entlang der Längsachse der Röhre über den Sphäroiden (6); und
- Messung der über den Sphäroiden (6) entlang der Längsachse der Röhre abfallenden Wechselspannung bei unterschiedlichen Frequenzen des Wechselstromflusses, um ein Impedanzspektrum zu erhalten.

8. Verfahren nach Anspruch 7,

dadurch gekennzeichnet,

- dass das Einbringen des Sphäroiden (6) mittels Ansaugen oder Einpressen durch Erzeugen eines Druckunterschiedes im Kulturmedium (5) durchgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8,

dadurch gekennzeichnet,

dass eine korrekte Positionierung des Sphäroiden (6) in dem Bereich (1) über die Erzeugung und Messung eines Gleichstromes entlang der Längsachse der Röhre im

Bereich (1) während des Einbringens des Sphäroiden (6) erfolgt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9,
5 dadurch gekennzeichnet,
dass zu charakterisierende Sphäroide (6) vor dem
Einbringen über ein Lochraster in der Größe
vorselektiert werden.